

**DIE RESORPTION
VON DEXAMETHASON - ISONIKOTINAT
NACH ORALER APPLIKATION**

von
Otto Jordan
aus
Nürnberg

1972 № 308

Aus der 2. Medizinischen Klinik
der Städt. Krankenanstalten Nürnberg
Vorstand: Professor Dr. R. Schubert

DIE RESORPTION VON DEXAMETHASON - ISONIKOTINAT NACH ORALER APPLIKATION

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Otto Jordan
aus
Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. G. Koch

Referent: Prof. Dr. R. Schubert

Korreferent: Prof. Dr. F. Heim

Tag der mündlichen Prüfung: 28. 3. 1972

GLIEDERUNG

A	Einführung in die Thematik	Seite
	1. Corticosteroide	1
	2. Dexamethason-21-isonikotinat	3
B	Eigene Untersuchungen	
	1. Fragestellung	5
	2. Versuchsanordnung und -durchführung	6
C	Diskussion	17
D	Zusammenfassung	21
	Literatur	22
	Tabellen und Abbildungen	



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A Einführung in die Thematik

I.) Corticosteroide

In den letzten Jahren wurden zahlreiche synthetische Corticosteroide geprüft, deren biologische Eigenschaften und physikalisch-chemisches Verhalten durch Veränderungen am Steroidgerüst und durch Veresterung im Vergleich zum Cortison wesentlich gewandelt wurden.

Die Wirkungsqualität wurde vor allem durch Abwandlungen am Grundgerüst des Steroidmoleküls verändert.

Durch die Einführung gewisser Substituenten, wie zum Beispiel Halogene, Methyl- und OH-Gruppen, in verschiedene Positionen des Steroidmoleküls können zum Teil die mineralocorticoiden und zum Teil die glukocorticoiden Eigenschaften gesteigert oder gehemmt werden (1 - 5). Durch Kombination entsprechender Substituenten ließen sich die Wirkungen addieren, sodaß man zu einigen hochwirksamen Verbindungen kam, wie zum Beispiel dem 2-alpha-Methyl-9-alpha-Fluorocortisol, einem Mineralocorticoid, und dem 16-alpha-Methyl-9-alpha-Fluoroprednisolon, dem Dexamethason (1, 2, 6, 7, 8).

Daneben wurden schon frühzeitig die Wirkungen untersucht, die man durch Veresterung von Steroidhormonen erzielen konnte (9, 10). Durch die Veresterung wurde vor allem das physikalisch-chemische Verhalten beeinflusst, während sich die biologischen Eigenschaften nicht grundsätzlich veränderten. Bei einem Teil der Derivate ließen sich jedoch auch esterspezifische Wirkungen nachweisen.

So war bei Estern der Androgene, Oestrogene und Gestagene die Wirkung nicht nur verlängert, sondern auch erheblich verstärkt (11 - 14). Auch beim Cortexon ließ sich die Wirkung im Tierversuch durch Veresterung mit verschiedenen Fettsäuren nach parenteraler Anwendung deutlich verlängern, aber nicht verstärken (15).

Ebenso war die Wirkung einiger Fettsäureester des Cortisols und Cortisons nach parenteraler Anwendung im Thymusinvolutionsstest verlängert (16).

Gleiches gilt für das Prednisolon-21-azetat (18).

Diese Substanz wirkt vor allem nach parenteraler Zufuhr gegenüber einer äquimolaren Dosis des Prednisolons nicht nur erheblich länger, sondern auch wesentlich stärker.

Wurden die Glukocorticoidester oral angewendet, ließ sich meist keine deutliche Wirkungsverlängerung und -verstärkung beobachten (17). Die Ester scheinen hierbei nahezu quantitativ verseift zu werden, sodaß sie lediglich als primäre Alkohole wirken. Jedoch ist für einige Prednisolon-21-ester nach oraler Applikation eine gesteigerte thymolytische und antiphlogistische Aktivität nachgewiesen (19).

Als Ursache für die gesteigerte Wirkungsdauer der Ester nimmt man an, daß die zumeist wasserunlöslichen Verbindungen verzögert resorbiert werden (17). Auch werden die Bildung sekundärer Depots in den Zellipiden sowie ein verlangsamter Metabolismus diskutiert. Jedoch ist die teilweise stärkere Wirkung der Ester nur durch die Teilnahme unverseiften Materials an der Gesamtwirkung erklärbar, wobei unabhängig von der Wasserlöslichkeit auch die Art des Säureradikals eine wesentliche Rolle für den Wirkungsmodus und die Wirkungsstärke der einzelnen Verbindungen spielt.

So hat zum Beispiel das wasserunlösliche tertiäre Butylazetat des Prednisolons einen sehr rasch einsetzenden Effekt gegen das Histamin- und Serotoninasthma des Meerschweinchens. Im Gegensatz dazu wirken die gut wasserlöslichen Ester, wie das Tetrahydrophthalat und Natriumphosphat des Prednisolons und Dexamethasons, bei i.m.-Applikation verzögert (20).

Auch verschiedene andere Ester des Dexamethasons und Prednisolons weisen auf die Bedeutung des Säureradikals hin (20). Hierbei wirken die analogen Ester jeweils ähnlich gegen das Histamin- und Serotoninasthma des Meerschweinchens.

Auch bei lokaler Anwendung ist für eine Reihe von Corticosteroidestern ein esterspezifischer, vom Radikal mitbestimmter Effekt nachgewiesen worden (17).

II.) Dexamethason-21-isonikotinat

Als eine besonders interessante Substanz unter den synthetischen Corticosteroidestern imponiert das Dexamethason-21-isonikotinat (DI). Die Strukturformel dieses Esters ist der Abbildung 1 zu entnehmen.

Über diesen Ester liegen schon eine Reihe tierexperimenteller und klinischer Arbeiten vor.

In den tierexperimentellen Arbeiten wurde das DI an der Ratte in seiner biologischen Wirksamkeit mit seinem freien Alkohol, dem Dexamethason (D), verglichen.

Bei oralen Anwendung unterschieden sich die beiden Substanzen nur geringfügig, was dafür spricht, daß der Ester entweder schon im Intestinum der Ratte oder kurz nach der Resorption rasch verseift wird.

Anders waren die Verhältnisse dagegen bei lokaler und parenteraler Applikation (21).

Hier übertraf der Ester den freien Alkohol in den anti-phlogistischen und glukoneogenetischen Eigenschaften (21), während die unerwünschten Wirkungen auf den Mineralhaushalt und das Nebennierenrindensystem eher geringer waren als beim D (22).

Akute und subakute Toxizität gingen nicht über die Steroidnatur der Substanz hinaus (21).

Weiterhin konnte in einer bisher nicht veröffentlichten Arbeit gezeigt werden, daß in vitro die Esterbindung des DI in Rattenblut wesentlich schneller als in menschlichem Blut gespalten wird (25).

Während in Rattenblut nach einer Stunde kein Ester mehr nachweisbar ist, sondern nurmehr sein freier Alkohol, finden sich in menschlichem Blut noch 50 % - 60 % und nach zwei Stunden noch immer 25 % des Esters. Diese Tatsache besonders zu erwähnen, erscheint uns im Hinblick auf unsere eigene Arbeit und die sich daraus ergebenden klinischen Folgerungen wichtig.

Die klinischen Arbeiten beschäftigen sich vor allem mit der Anwendung des DI als Dosieraerosol bei verschiedenen Lungenaffektionen (27 - 35). Hierbei erwies sich der Ester als sehr günstig bei der Behandlung von chronischen hyperergischen Bronchospastikzuständen sowie als Zusatztherapie bei der exsudativ-infiltrativen Lungentuberkulose. Beim akuten Asthmaanfall sowie der produktiven Lungentuberkulose war er weniger wirkungsvoll.

Erwähnenswert sind noch Untersuchungen über die Transcortinbindung des DI im menschlichen Plasma (23).

Von dieser Transcortinbindung werden pharmakologische Wirksamkeit und biologische Inaktivierung ganz wesentlich mitbestimmt. Die Untersuchungen ergaben, daß das DI nur wenig an das Transcortin gebunden wird, im Gegensatz zum körpereigenen Cortisol, das ja zum großen Teil gebunden vorliegt.

B Eigene Untersuchungen

I.) Fragestellung

Ein uns sehr wichtig erscheinendes Problem blieb durch die bisherigen Untersuchungen noch ungeklärt, nämlich die Frage, ob und gegebenenfalls inwieweit das DI beim Menschen aus dem Magen-Darmtrakt ins Blut resorbiert wird. Denn, wenn es gelingen sollte, eine Resorption nachzuweisen, wäre für die Klinik ein Corticosteroid gewonnen, das - die Tierversuche lassen dies als möglich erscheinen - unter Umständen wirkungsstärker ist als die herkömmlichen Corticosteroide, das jedoch keine vermehrten negativen Steroidwirkungen aufweist.

Zwar ist schon einmal im Rahmen der Aerosolveruche gezeigt worden, daß sich unter der Aerosolanwendung der Serumcortisolspiegel signifikant senkt, jedoch ist dies nur ein sehr indirekter Beweis (26). Er läßt zudem keine Aussage darüber zu, ob der Ester selbst oder nur Spaltprodukte resorbiert worden sind. Auch wäre damit eher eine Resorption via Respirations-trakt bewiesen, wenngleich bei der Sprayanwendung sicher Material verschluckt worden ist, sodaß eine enterale Resorption im Bereich des Möglichen gelegen war.

Wir haben uns daher die Aufgabe gestellt, DI nach enteraler Resorption im Blut nachzuweisen. Zu diesem Zweck haben wir im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen geprüft, ob das DI

1. nach oraler Applikation von 100 mg in magenlöslichen Gelatine kapseln im Blut gesunder Probanden nachweisbar ist,

2. nach oraler Applikation verseift wird und, falls ja, welche Mengen an D im Blut nachgewiesen werden können,
3. nach oraler Applikation unverändert im Urin ausgeschieden wird.

II.) Versuchsanordnung und -durchführung

1.) Blutspiegel von DI und D

a) Methodik

Zum Nachweis der gesuchten Substanzen aus dem Blut haben wir uns einer säulenchromatografischen Methode bedient, die wir im Folgenden in drei Einzelabschnitten beschreiben:

Die Extraktion des DI beziehungsweise D aus dem menschlichen Vollblut.

Die Fraktionierung von DI und D.

Die quantitative Auswertung.

Die Extraktion aus dem menschlichen Vollblut

Prinzip: Aus Plasma werden das DI und das D mittels Essigsäureaethylester extrahiert. Mitenthalten ist in diesem Extrakt körpereigenes Cortisol.

Reagentien: Aqua bidestillata, Petrolaether (Siedepunkt 40°C), Essigsäureaethylester (Merck), 0,1 N NaOH

Arbeitsgang: Heparinisiertes Vollblut wird sofort nach der Entnahme zentrifugiert. Von dem überstehenden Plasma werden 20 ml abpipettiert.

Dieses Plasma wird in 50 ml Aqua bidest. und 120 ml Petrolaether eingebracht und eine Minute geschüttelt, um Lipide zu entfernen. Hier-
nach wird die Petrolaetherphase mit einem Scheidetrichter abgetrennt und verworfen. Die Plasmaphase wird anschließend zweimal mit 150 ml Essigsäureaethylester je eine Minute lang extrahiert. Die vereinigten Essigsäureaethylesterphasen werden dann 15 Sekunden lang mit 30 ml 0,1 N NaOH gewaschen und die NaOH verworfen. Anschließend wird der gleiche Vorgang noch einmal mit 30 ml Aqua bidest. wiederholt. Danach wird die gewaschene Essigsäureaethylesterphase über ein Faltenfilter mit wasserfreiem Natriumsulfat abfiltriert und in Stickstoffathmosphäre im Rotationsverdampfer zur Trockne eingeengt.

Die Fraktionierung von DI und D

Prinzip: Aus Plasmaextrakt werden das DI und das D über eine Kieselgelsäule fraktioniert, deren Durchlaufgeschwindigkeit für die genannten Substanzen vorher mit Hilfe von Reinsubstanzen ermittelt worden ist.

Reagentien: Kieselgel G-HR (Macherey & Nagel - mittlere Korngröße 5 - 25 µ), Aethanol 96 %, Chloroform

Arbeitsgang: 4 Gramm Kieselgel werden in eine Säule von 1 cm Durchmesser mit Chloroform eingeschlemmt und vorgereinigt. Die in Chloroform aufgenommenen Reinsubstanzen des DI und des D werden auf die Säule aufgetragen und unter einem konstanten Stickstoffdruck von 50 mm Hg

mit Chloroform/Aethanol im Verhältnis 92 : 8 von der Säule heruntergewaschen.

Das Auftragen des Lösungsmittels beziehungsweise das sofort danach erfolgende Anschließen an den Stickstoffdruck gilt als Start der Fraktionierung. Der Startzeitpunkt ist in den Abbildungen 2 - 6 mit "S" gekennzeichnet.

Das von der Säule abfließende Eluat wird durch eine Durchlaufküvette geleitet (Schichtdicke 2 cm, Volumen 0,39 ml), die in einem Zeißphotometer eingebaut ist. Die von diesem Photometer bei einer Wellenlänge von 240 nm fortlaufend gemessenen Extinktionen werden von einem Siemens Kompensographen registriert. Hierbei kommt es zu dem in Abb. 2 festgehaltenen Kurvenverlauf mit dem Auftreten eines ersten, sehr kleinen Peak (P1), der dem Lösungsmittel entspricht, einem zweiten, großen Peak (P2), der durch das DI bedingt ist, und einem dritten, großen Peak (P3), der durch das D verursacht wird. Anhand dieses Kurvenverlaufes wird dann die Durchlaufgeschwindigkeit der Säule für DI und D festgestellt.

Anschließend wird der in Chloroform aufgenommene Plasmaextrakt, dessen Gewinnung schon beschrieben worden ist, auf die Säule aufgetragen, mit Chloroform gereinigt und dann unter den gleichen Bedingungen wie oben mit Chloroform/Aethanol von der Säule heruntergewaschen.

Hierbei kommt es zu Kurvenverläufen, wie sie in Abb. 3 - 6 festgehalten sind. Die Abb. 3 entspricht dem Plasmaleerwert, Abb. 4 - 6 sind die zugehörigen Hauptwerte nach Einnahme des DI. Die abgebildeten Kurven stammen von Fall 3 der Tabelle 1.

Wie die Abb. 4 - 6 erkennen lassen, ist es meist nicht möglich, die Fraktionen des DI und D nur aufgrund der auftretenden Peaks festzulegen, da diese fast immer von zusätzlichen, aus dem Plasma stammenden Extinktionen überdeckt werden. Daher ist es erforderlich, sie durch Ausmessen auf den Kurven zu identifizieren und aufzufangen.

Bei diesem Trennungsgang werden zwei Fraktionen gewonnen: die eine enthält das DI, die zweite das D und körpereigenes Cortisol. Beide zeigen unter unseren Versuchsbedingungen fast identische Durchlaufgeschwindigkeiten. Die beiden Fraktionen werden in Stickstoffatmosphäre zur Trockne eingeengt und in 1 ml 96 %igem Aethanol wiederaufgenommen.

Die quantitative Auswertung

Für die quantitative Auswertung der beiden Fraktionen bedienten wir uns einer von HÖLZEL für das Aldosteron angegebenen Mikroreaktion mit Tetrazolblau (36). D und Cortisol werden dabei zusammen bestimmt, da sie in einer Fraktion vorliegen. Die Menge des Cortisols kann in einem zweiten Schritt fluorometrisch nach DE MOOR und Mitarbeiter gemessen werden (37), wobei das D nicht stört, wie eigene Untersuchungen ergeben haben. Die Differenz beider Bestimmungen liefert den Gehalt an D.

Prinzip der Tetrazolblaureaktion: Tetrazoliumsalz wird durch die Ketolseitenkette des D zu Formazan reduziert. Das DI wird in dieser Reaktion zum Teil verseift und dann als D nachgewiesen. Das Formazan kann mit dem Eppendorf-Photometer quantitativ bestimmt werden.

Reagentien: R I - 100 mg Tetrazolblau in 20 ml 96 %igem Aethanol gelöst; R II - 1 g Tetramethylammoniumhydroxyd in 10 ml Aqua bidest. gelöst, hiervon 1 ml mit 9 ml 96 %igem Aethanol gemischt; R III - Eisessig

Arbeitsgang: Zu 0,25 ml der in Aethanol aufgenommenen Trockne werden 0,05 ml R I und 0,05 ml R II gegeben. Nach gutem Durchmischen wird die aufgenommene Trockne für 25 Minuten im Dunklen aufbewahrt. Danach wird die Reaktion mit R III abgestoppt.

Anschließend mißt man die Extinktion am Eppendorf-Photometer bei 546 nm gegen einen aethanoligen DI-Standard beziehungsweise D-Standard. Zusätzlich wird die Extinktion eines aethanoligen Cortisolstandard gemessen, um die in der Fluoreszenzreaktion gewonnenen Werte in Extinktion umrechnen zu können. Von jeder Probe werden Doppelbestimmungen ausgeführt. Zur Messung werden Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von 10 mm und einem Volumen von 0,3 ml verwendet.

Prinzip der Fluoreszenzreaktion: Nach Behandlung mit Aethanol-Schwefelsäure zeigt das Cortisol eine Fluoreszenz, die mit dem Aminca-Bowman-Spektralfluorometer gemessen werden kann.

Reagentien: Methylenchlorid, das in folgender Weise vorbehandelt wurde: einmal mit 0,2 Volumen 1 N NaOH und zweimal mit 0,2 Volumen Aqua bidest. waschen. Dann mit 0,4 Volumen 30 N Schwefelsäure behandeln. Anschließend zweimal mit je 0,2 Volumen Aqua bidest. weiterwaschen, mit wasserfreiem Natriumsulfat trocknen und dann destillieren.

Fluoreszenzgemisch: unter Kühlung langsam drei Teile konzentrierter Schwefelsäure in einen Teil 96 %iges Aethanol einrühren.

Arbeitsgang: 0,2 ml der in Aethanol aufgenommenen D-Cortisolfraktion werden in Stickstoffatmosphäre zur Trockne eingeengt und mit 5 ml Methylenchlorid wiederaufgenommen. Dazu werden 3 ml Fluoreszenzgemisch gegeben. Nach 15 Minuten wird das Fluoreszenzgemisch abpipettiert und das Methylenchlorid verworfen. Anschließend wird die Fluoreszenz des Fluoreszenzgemisches mit dem Aminca-Bowman-Spektralfuorometer bei einer Anregung von 460 nm und einer Emission von 520 nm gegen einen Cortisolstandard gemessen. Es werden von jeder Probe Doppelbestimmungen ausgeführt.

Zur exakten Auswertung der Meßergebnisse waren Eichkurven erforderlich (Abb. 7 - 10). Abb. 7 zeigt die Eichkurve des DI, Abb. 8 die des D. Beide Kurven wurden mit Hilfe der Tetrazolblaureaktion gewonnen. Abb. 9 zeigt die Eichkurve des Cortisols, die durch die Fluoreszenzmessung erstellt wurde. Abb. 10 gibt zwei Eichkurven wieder, die beide mit Hilfe der Tetrazolblaureaktion ermittelt wurden. Kurve I ist eine reine Cortisolkurve, Kurve II gibt Meßergebnisse wieder, bei denen jeder Cortisolprobe 4 Gamma D zugesetzt worden sind.

Wie die Abbildungen zeigen, steigen alle Kurven in unserem Meßbereich linear an. Verdoppelt man die Substanzmenge, so verdoppeln sich auch Extinktion beziehungsweise Fluoreszenz. Weiterhin geht aus Abb. 10 hervor, daß das Vorhandensein von D und Cortisol in einer Probe die Tetrazolblaureaktion nicht stört.

Kurve I und Kurve II verlaufen fast parallel. Kurve II befindet sich lediglich auf einem erhöhten Niveau.

Es ist also möglich, die gewonnenen Meßwerte direkt in Gewichtseinheiten umzurechnen. Wir sind folgendermaßen vorgegangen: der Gehalt an DI wurde direkt aus den gemessenen Extinktionen errechnet, wobei die Extinktion des entsprechenden Plasmaleerwertes abgezogen wurde.

Bei der Bestimmung des D wurden zunächst die Meßergebnisse der Fluoreszenzbestimmung des Cortisols in Extinktion umgerechnet. Die auf diese Weise ermittelte Extinktion des Cortisols wurde dann von der entsprechenden Extinktion der Te-trazolblaureaktion in Abzug gebracht. Die um den Cortisolwert verminderte Extinktion der Te-trazolblaureaktion wurde in gleicher Weise wie beim DI dazu verwendet, den Gehalt an D zu errechnen.

b) In vitro-Überprüfung der Methode

In zusätzlichen Untersuchungen haben wir geprüft, mit welchen Substanzverlusten und welcher Streubreite bei der vorbeschriebenen Methode zu rechnen ist. Hierbei haben wir die Reinsubstanzen des DI und des D zum Teil direkt auf die Säule aufgetragen, zum Teil haben wir sie frischem menschlichem Blutplasma zugesetzt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 11 zusammengefaßt, wobei jeder Punkt einen Versuch darstellt. Spalte I gibt die Ergebnisse beim Auftragen von Reinsubstanzen wieder, Spalte II die Ergebnisse der Plasmarückgewinnung. Ver-ständlicherweise finden sich beim direkten Auf-trag von Reinsubstanz eine bessere Ausbeute und geringere Streuung der Werte.

Im Mittel werden vom DI 75.5 % und vom D 67 % wiedergefunden.

Wird das DI beziehungsweise D frischem Blutplasma zugesetzt, so werden im Mittel 45 % des DI und 54 % des D rückgewonnen. Die Werte liegen also deutlich niedriger als beim direkten Auftragen der Reinsubstanzen. Dies ist aufgrund der zahlreichen Zwischenschritte bei der Analyse auch zu erwarten. Nicht als methodisch bedingt sehen wir jedoch die Tatsache an, daß die Werte für das DI deutlich niedriger liegen als für das D. Wir führen dies darauf zurück, daß der Ester im Plasma zum Teil verseift wird.

c) Versuchsdurchführung

Unsere Untersuchungen wurden an 14 gesunden Probanden durchgeführt. Es handelte sich um 9 Männer und 5 Frauen zwischen 15 und 45 Jahren. Die Versuche begannen stets um 8 Uhr, um in Anbetracht der körpereigenen, tageszeitabhängigen Steroidproduktion vergleichbare Werte zu erhalten. Vor Versuchsbeginn waren die Probanden 12 Stunden lang nüchtern gelassen worden. Zuerst wurden die entsprechenden Blutleerwerte abgenommen. Dann erhielten die Probanden 100 mg DI in magenlöslichen Gelatinekapseln. Die weiteren Blutentnahmen erfolgten in verschiedenen Zeitabständen, die aus den Tab. 1 - 3 ersichtlich sind. Bei Proband Nr 1, Nr 2 und Nr 3 (Tab. 1) wurde nach 20, 40 und 60 Minuten je eine Probe entnommen. Bei Proband Nr 4 wurde nach 60 und 120 Minuten und bei Proband Nr 5 nach 30, 60 und 120 Minuten je eine Blutprobe gewonnen (Tab. 2).

Bei den Probanden Nr 6, Nr 7 und Nr 8 wurde nach 40 Minuten die doppelte beziehungsweise dreifache Menge Blut entnommen, geteilt und getrennt aufgearbeitet (Tab. 3), um die Streubreite unserer Methode in vivo zu kontrollieren.

Bei den 6 weiteren Probanden wurde in drei Fällen nach 20, 40 und 60 Minuten Blut abgenommen und in den drei restlichen Fällen wurde nach 40 Minuten eine doppelte Blutprobe gewonnen und getrennt analysiert.

d) Ergebnis

Bei den 6 letztgenannten Probanden - 4 Männer zwischen 24 und 36 Jahre alt, 2 Frauen, 24 und 40 Jahre alt - war es nicht möglich, DI oder D innerhalb des von uns gewählten Beobachtungszeitraumes nachzuweisen. In diesen Fällen ist lediglich der Nachweis des Cortisols gelungen. Aus den Cortisolwerten läßt sich jedoch kein Rückschluß auf eine eventuelle Resorption des DI ziehen. Daher wurde auf eine Wiedergabe der Werte verzichtet.

Die Ergebnisse der übrigen 8 Probanden sind in den Tab. 1 - 3 zusammengefaßt. Außerdem wurden die DI- und D-Werte der Tab. 1 und 2 in Abb. 12 grafisch dargestellt. Der dem jeweiligen DI-Wert entsprechende D-Wert wurde in derselben Säule schwarz abgesetzt. Die Zahl über der Säule ist die jeweilige Probandennummer der Tab. 1 beziehungsweise 2.

Wie die Grafik zeigt, liegt das Resorptionsmaximum für das DI zwischen der 20. und 40. Minute p. appl. Im Gegensatz zum relativ raschen Ansteigen der Blutspiegelwerte kommt es

jedoch nicht zu einem gleichsinnigen Verhalten beim Abfallen der Werte. Nach Überschreiten der Maximalwerte läßt sich das DI auch nach 120 Minuten noch mit Werten nachweisen, die im Vergleich zu den Spitzenwerten als recht hoch imponieren.

Sieht man von dem 40-Minuten-Wert des Probanden Nr 3 mit 13 Gamma/20 ml Plasma ab, vermitteln die übrigen Werte den Eindruck eines recht konstanten DI-Blutspiegels für den Beobachtungszeitraum von 120 Minuten.

Für das D ergibt sich dagegen von Fall zu Fall ein etwas anderes Bild. Bei Proband Nr 2 konnte überhaupt kein D nachgewiesen werden, bei Proband Nr 5 erst nach 120 Minuten. In Fall Nr 1 und 3 steigen dagegen die D-Werte parallel zu den DI-Werten an.

Bei einem Vergleich von DI und D fällt jedoch auf, daß die Werte für das D deutlich unter denen des DI liegen, selbst wenn man das D auf eine äquimolare Dosis DI umrechnet. Auf die Folgerungen, die hieraus zu ziehen sind, kommen wir noch zurück.

Das Ergebnis der getrennten Analyse derselben Blutprobe bestätigt in den Fällen 6 und 7 die in-vitro-Erfahrungen über die Schwankungsbreite der Bestimmungsmethode. Fall 8 fällt dagegen aus dem Rahmen, seine Werte sind unbrauchbar.

2.) Renale Elimination von DI

a) Methodik

Das DI wiesen wir im Urin mit der zweidimensionalen Dünnschichtchromatografie nach.

Angewendet wurde die Standardmethode nach STAHL (40 - 44), mit der sich nach unseren Feststellungen noch 1 Gamma/ml Urin nachweisen lassen.

Prinzip: Das DI wird mit 1,2-Dichloraethan aus dem Urin extrahiert. Der Extrakt wird mittels einer hitzeaktivierten, mit Kieselgel G beschichteten Dünnschichtplatte getrennt. Das DI wird anhand einer mitgelaufenen Vergleichssubstanz lokalisiert.

Reagentien: H_3PO_4 40 %ig, Aethanol 96 %ig, 1,2-Dichloraethan, Chloroform. Als Laufmittel Chloroform:Azeton:Eisessig = 7 : 2 : 1, Kieselgel G (Merck).

Arbeitsgang: 20 ml Urin werden zweimal mit der dreifachen Menge 1,2-Dichloraethan ausgeschüttelt und die vereinigten Extrakte zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird mit 0,6 ml 96 %igem Aethanol aufgenommen. 0,2 ml des aethanoligen Extraktes werden nun auf eine mit Kieselgel G beschichtete und bei $160^{\circ}C$ im Trockenschrank aktivierte Dünnschichtplatte aufgetragen. Danach wird der aufgetragene Extrakt in der einen Laufrichtung mit Chloroform (Rf-Wert für DI = 0) gereinigt. Anschließend wird in der zweiten Laufrichtung bei Kammerfüllung und einer Laufstrecke von 15 cm mit Chloroform/Azeton/Eisessig getrennt. Die Platte wird dann mit 40 %iger H_3PO_4 besprüht und 10 Minuten bei $130^{\circ}C$ im Trockenschrank entwickelt. Das DI läßt sich nun unter filtriertem UV-Licht (360 nm) nachweisen.

b) Versuchsdurchführung

Die Untersuchungen wurden an 6 gesunden Probanden

(4 Männer, zwischen 20 und 30 Jahre alt, 2 Frauen, 17 und 24 Jahre alt) durchgeführt. Den 12 Stunden nüchtern gebliebenen Probanden wurde nach Abnahme eines Leerurines zwischen 8 und 10 Uhr 100 mg DI in magenlöslichen Gelatine kapseln gegeben. Der gesamte Urin wurde anschließend fraktioniert in zweistündigem Abstand insgesamt 16 Stunden gesammelt. Die Harnproben wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren analysiert.

c) Ergebnis

In keinem einzigen Fall ist es gelungen, DI im Urin nachzuweisen.

Nachdem unsere Methode so empfindlich ist, daß sich damit noch 1 Gamma/ml Urin nachweisen lassen, kann man daraus ableiten, daß, falls überhaupt DI über die Niere ausgeschieden wurde, diese renale Elimination bezogen auf eine Harnmenge von 1000 ml unter 1 mg DI liegen muß.

C Diskussion

Bei nur 8 von 14 Probanden ist es uns gelungen, nach oraler Applikation DI aus dem Vollblut nachzuweisen. Daraus ergibt sich zunächst einmal die Frage, ob die Tatsache, daß der DI-Nachweis im Blut bei 6 Probanden negativ blieb, nur methodisch bedingt ist oder ob wirklich weder DI noch D resorbiert wurden. Falls letztere Vermutung zutrifft, so würde dies bedeuten, daß bei der Resorption von DI aus dem menschlichen Intestinum auch individuelle Momente eine Rolle spielen.

Wir glauben, daß beide Faktoren, also sowohl Nachweismethode als auch individuelle Disposition, hier zusammenwirken, ohne daß wir aufgrund unserer Ergebnisse zu sagen vermöchten, welcher der beiden Faktoren dabei dominiert. Wir sind jedoch überzeugt, daß trotz der großen Streuungsbreite, die die Methode besitzt, in den 6 Fällen zumindest teilweise ein Substanznachweis hätte gelingen müssen. Da dies nicht der Fall war, schließen wir daraus, daß in diesen 6 negativ verlaufenen Versuchen während des Beobachtungszeitraumes keine nennenswerten Mengen an DI und D resorbiert worden sind.

Wesentlich für einen therapeutischen Einsatz des DI erscheint uns auch die Frage, ob der Ester im menschlichen Intestinum stabil ist oder ob er vielleicht schon dort zu einem großen Teil gespalten wird, sodaß nurmehr das D zur Resorption gelangt.

Es liegen zwar in vitro-Untersuchungen vor (22), die zeigen, daß er im Duodenalsaft nicht absolut beständig ist. In vivo scheint das DI aufgrund unserer eigenen Ergebnisse zumeist ziemlich stabil zu sein. Hierfür sprechen unseres Erachtens zunächst einmal die 6 negativ verlaufenen Versuche. Bei Ihnen hätte, falls der Ester in größeren Mengen im Intestinum gespalten worden wäre, zumindest das D nachgewiesen werden müssen. Weiterhin spricht dafür auch die Tatsache, daß bei 7 der 8 positiven Fälle die Blutspiegel für den Ester deutlich höher liegen als für seinen freien Alkohol. In einem Fall war überhaupt kein D nachweisbar. Wäre der Ester überwiegend schon im Intestinum

gespalten worden, müßte es ja gerade ungekehrt sein.

Daß im Blut mehr DI als D gefunden wurde, läßt auch darauf schließen, daß der Ester nach der Resorption im Gegensatz zu vielen anderen Steroidestern die Leber zum großen Teil wohl ungespalten passiert. Das Resorptionsmaximum liegt dabei zwischen der 20. und 40. Minute. Bedeutungsvoller noch als die dabei erreichten Spitzenwerte erscheint die Tatsache, daß der Ester nach Überschreiten des Maximums noch nach 120 Minuten p. appl. in gleichmäßigen Blutspiegeln nachgewiesen werden kann, die im Vergleich zu den Spitzenwerten als hoch imponieren. Der Ester scheint also auch nach der Resorption und der primären Leberpassage recht stabil zu sein.

Hinsichtlich der Spaltungsgeschwindigkeit finden sich allerdings ebenso wie bei der Resorption gewisse individuelle Unterschiede. In 2 Fällen steigt der Ester, ebenso wie das D, im Blut an und fällt auch analog ab, wobei das D auf einem niedrigeren Niveau bleibt. In 1 Fall tritt das D erst sehr spät und in einem weiteren garnicht auf.

Daß das DI solange nachweisbar bleibt, hängt möglicherweise auch noch mit seiner guten Lipidlöslichkeit zusammen. Es wäre durchaus denkbar, daß er nach der Resorption rasch im Fettgewebe und den Zelllipiden gespeichert wird, ein Vorgang, der auch durch die geringe Transcortinbindung noch gefördert werden dürfte. Aus diesen Depots könnte der Ester dann erneut in den intravasalen Raum abgegeben werden, sodaß

dadurch für längere Zeit ein entsprechender DI-Spiegel unterhalten wird.

Wie hoch der Blutspiegel des DI in Wirklichkeit ist, läßt sich nur schätzen. Bei Berücksichtigung aller durch die Methode bedingten Verluste dürften die Blutspiegelwerte etwa doppelt bis dreimal so hoch sein wie die von uns gefundenen Werte. Jedoch wird man derartige Berechnungen angesichts der großen Streubreite der Methode nur unter großem Vorbehalt anstellen können.

Ein genauer Aufschluß über die resorbierte Substanzmenge, über den zeitlichen Ablauf der Resorption und den Metabolismus läßt sich nach unserer Auffassung nur über den Einsatz radioaktiv markierter Substanz gewinnen. Die von uns verwendete Methode, die auf einem Steroidnachweis mittels Tetrazolblaureaktion beruht, ist hierfür zu unspezifisch, da sie auf andere reduzierende Substanzen, die chromatografisch nicht völlig abzutrennen sind, ebenfalls anspricht.

Wir betrachten daher unsere Arbeit nur als einen ersten Schritt, der zunächst einmal den Beweis dafür erbracht hat, daß die Mehrzahl eines nicht ausgewählten Kollektivs DI nach oraler Applikation ungespalten aus dem Intestinum resorbiert.

Offen bleiben muß allerdings, ob der negative Ausgang von 6 Fällen methodisch bedingt ist oder ob hier individuelle physiologische Gegebenheiten eine Rolle spielen.

Aufgrund der bewiesenen Resorption scheint es jedoch lohnend, die Substanz klinisch zu testen, um herauszufinden, ob die im Tierversuch bei parenteraler Anwendung beobachtete Wirkungsverstärkung bei gleichzeitig verminderten negativen Wirkungen gegenüber dem D beim Menschen auch nach oraler Gabe beobachtet werden kann.

D Zusammenfassung

20 Probanden (Alter 15 bis 45 Jahre) wurde 100 mg Dexamethason-21-isonikotinat peroral verabreicht. Mittels Säulenchromatografie wurden bei 14 Probanden die Blutspiegel, mittels Dünnschichtchromatografie wurde bei 6 Probanden die renale Elimination untersucht.

Dabei zeigte sich, daß bei 8 von 14 Probanden das Dexamethason-21-isonikotinat als solches resorbiert wird und im Blut nachgewiesen werden kann. Die Plasmaspiegel liegen zwischen 8 und 65 Gamma%. Bei den 6 Fällen, bei denen kein Dexamethason-21-isonikotinat gefunden wurde, muß offen bleiben, ob es an der Nachweismethode lag oder ob individuelle physiologische Gegebenheiten bei der Resorption eine Rolle spielten.

Für eine quantitative Analyse erscheint die säulenchromatografische Methode nur bedingt tauglich.

Bei weiteren 6 Probanden wurde die renale Elimination von Dexamethason-21-isonikotinat über einen Zeitraum von 16 Stunden verfolgt. Die Untersuchungen ergaben, daß das Dexamethason-21-isonikotinat, falls es überhaupt im Urin ausgeschieden wird, nur in einer Menge unter 0,1 mg% im Tagesharn erscheint.

LITERATUR

- (1) Wettstein, A.: Mschr. Kinderhk. 108(1960)164
- (2) Heftmann, E., Mosettig, R.: Biochem. of Steroids, New York, London (1960)130
- (3) Thorn, G.W., Goldfien, A., Beigleman, P.M. und Laidlaw, J.C.: J.clin.Endocr. 14(1954)782
- (4) Hogg, J.A., Lincoln, F.H., Jackson, R.W., Schneider, P.W.: J.Amer.chem.Soc. 77(1955)6401
- (5) Bernstein, S.: Recent Progr. Hormone Res. 14(1958)1
- (6) Curling, K.J., Baron, D.N., Gore, M.B.R.: J.Endocr. 17(1959)319
- (7) Arth, G.E., Johnston, D.B.R., Fried, J., Sponcer, W.W., Hoff, D.R., Sarett, L.H.: J.Amer.Soc. 80(1958)3160
- (8) Oliveto, E.P., Rausser, R., Nussbaum, W.L., Gebert, W., Hershberg, L.B., Tolksdorf, S., Eisler, M., Perlman, P.L., Pechet, M.M.: J.Amer.Soc. 80(1958)4428
- (9) Butenandt, A.: Z.physiol. Chem. 191(1930)140
- (10) Butenandt, A., Tscherning, K.: Hoppe-Seylers Z.schr. physiol. Chem. 229(1934)185
- (11) Junkmann, K., Witzel, H.: Zschr. Vitamin-Hormon-Ferm. Forsch. 9(1958)97, 227
- (12) Junkmann, K.: Arch.exper.Pathol. Pharmacol. 215(1952)85
- (13) Junkmann, K.: Arch.exper.Pathol. Pharmacol. 220(1953)358
- (14) Junkmann, K.: Arch.exper.Pathol. Pharmacol. 223(1954)244
- (15) Junkmann, K.: Arch.exper.Pathol. Pharmacol. 227(1955)212
- (16) Junkmann, K.: Arch.exper.Pathol. Pharmacol. 223(1954)280
- (17) Junkmann, K.; Suchowsky, G.K.: Arzneim.-Forsch. 10(1960)921
- (18) Vogel, G.: Acta Endocr. (Kbh.) 42(1963)85
- (19) Alibrandi, A., Bruni, G., Ercoli, A., Gardi, R. und Meli, A: Endocrinology 66(1960)13
- (20) Zicha, L., Scheiffarth, F., Schmid, E., Weschta, W.: Arzneim.-Forsch. 10(1960)890

- (21) Engelhardt, G.: *Arzneim.-Forsch.* 13(1963)588
- (22) Ueberberg, H., Chuchra, U., Liebrich, K.: *Arzneim.-Forsch.* 16(1966)487
- (23) Weist, F., Zicha, L., Wolf, F., Sauerbrey, Ch.: *Arzneim.-Forsch.* 16(1966)667
- (24) Weisenberger, H., Pelzer, H.: *Therap.woche* 18(1968)28
- (25) Pelzer, H., Weisenberger, H.: *Orale Resorption von Dexamethasonisonikotinat in der Ratte und Spaltung des Esters im Blut von Tier und Mensch (unveröffentlicht) (1967)*
- (26) Laumen, F.: *Therap.woche* 18(1968)72
- (27) Bottke, H., Günther, W.: *Med. Klin.* 59(1964)1981
- (28) Mathey, H.G.: *Hippokrates* 37(1966)274
- (29) Wülfig, F.W., Pentrup, H.A., Höhfeld, H.H., Glock, H.G.: *Dtsch. Med. J.* 17(1966)404
- (30) Hess, K.: *Münch. Med. Wschr.* 109(1967)2140
- (31) Mlzech, F., Witek, F.: *Med. Welt* 15(1967)973
- (32) Stresemann, E.: *Klin. Wschr.* 45(1967)103
- (33) Laumen, F.: *Beitr. Klin. Tbk.* 135(1967)27
- (34) Schürger, R.: *Med. Mschr.* 22(1968)83
- (35) Loos, M., Simon, E.: *Therap.woche* 18(1968)110
- (36) Hölzel, W., Büchner, M.: *Acta biol. med. germ.* 19(1967)189
- (37) De Moor, P., Steeno, O., Raskin, M., Hendriks, A.: *Acta Endocr.* 33(1960)297
- (38) Randerath, K.: *Dünnschichtchromatografie* Verlag Chemie, Weinheim 1962
- (39) Hübener, H.J., Staib, W.H.: *Biochemie der Nebennierenrindenhormone*, Thieme Verlag, Stuttgart 1965
- (40) Stahl, E.: *Pharmazie* 11(1956)633
- (41) Stahl, E.: *Chem. Ztg.* 82(1958)323
- (42) Stahl, E.: *Arch. Pharmaz.* 292(1959)411
- (43) Stahl, E.: *Pharm. Rdsch.* 1, Nr. 2 (1959)1
- (44) Stahl, E.: *Dünnschichtchromatografie, ein Laboratoriumshandbuch*, Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1962

Proband Nr	Geschlecht	Alter (Jahre)	Blutentnahme nach...(min)	Dexamethason- isonikotinat (μ / 20ml)	Dexamethason (μ / 20ml)
1	m	30	20	4.10	2.30
			40	6.17	4.55
			60	4.32	2.32
2	m	45	20	6.70	neg.
			40	neg.	neg.
			60	1.60	neg.
3	m	36	20	2.35	1.36
			40	13.00	6.00
			60	6.95	3.86

Tab. 1: Blutplasmaspiegel von Dexamethasonisonikotinat und Dexamethason bei drei Probanden nach oraler Applikation von 100 mg Dexamethasonisonikotinat

Proband Nr	Geschlecht	Alter (Jahre)	Blutentn: hme nach...(min)	Dexamethason- isonikotinat (μ / 20ml)	Dexamethason (μ / 20ml)
4	w	40	60	3.56	1.13
			120	3.32	1.65
5	m	25	30	4.41	neg.
			60	3.05	neg.
			120	3.69	1.09

Tab. 2: Blutplasmaspiegel von Dexamethasonisonikotinat und Dexamethason bei zwei Probanden nach oraler Applikation von 100 mg Dexamethasonisonikotinat

Proband Nr	Geschlecht	Alter (Jahre)	Blutentnahme nach...(min)	Dexamethason- isonikotinat (μ / 20ml)	Dexamethason (μ / 20ml)
6	m	20	40	3.04	0.13
				3.90	neg.
7	w	42	40	1.50	2.40
				1.10	1.90
				2.10	2.20
8	w	15	40	0.30	0.40
				1.10	neg.
				5.00	1.00

Tab. 3: Blutplasmaspiegel von Dexamethasonisonikotinat und Dexamethason bei drei Probanden nach oraler Applikation von 100 mg Dexamethasonisonikotinat. Die nach 40 Minuten gewonnenen Blutproben wurden geteilt und getrennt analysiert.

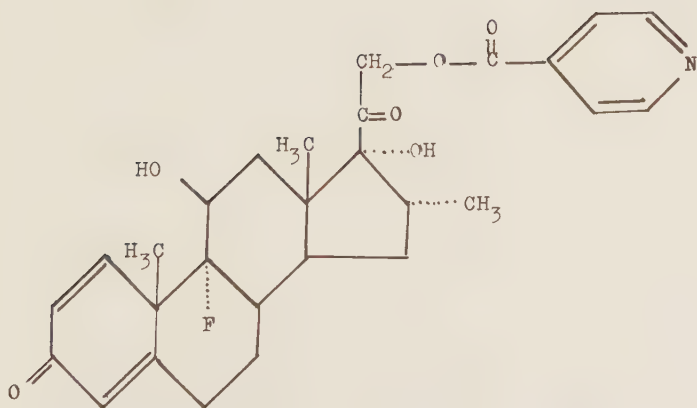


Abb. 1: Dexamethason-21-isonikotinat

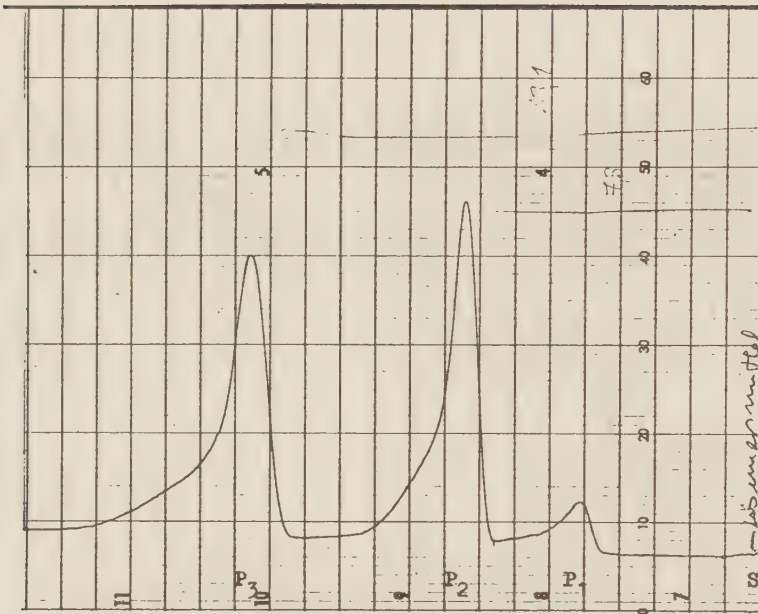


Abb. 2: Extinktionskurve (240 nm) eines Reinsubstanzengemisches von jeweils 5 μ g Dexamethasonisonikotinat und Dexamethason, das mit Hilfe einer Kieselgelsäule fraktioniert wurde. An Hand des Kurvenverlaufes wird die Durchlaufgeschwindigkeit dieser Kieselgelsäule für die genannten Substanzen ermittelt. S = Start der Fraktionierung, P_1 = Lösungsmittelpeak, P_2 = DI-Peak, P_3 = D-Peak



Abb. 3: Extinktionskurve (240 nm) des Plasmaleerwertes von Proband Nr 3, der über eine Kieselgelsäule fraktioniert wurde. Im Kurvenabschnitt $a_1 - a_2$ Separierung des Plasmaleerwertes für das DI, im Kurvenabschnitt $a_2 - a_3$ Separierung des Plasmaleerwertes für das D. S = Start der Fraktionierung

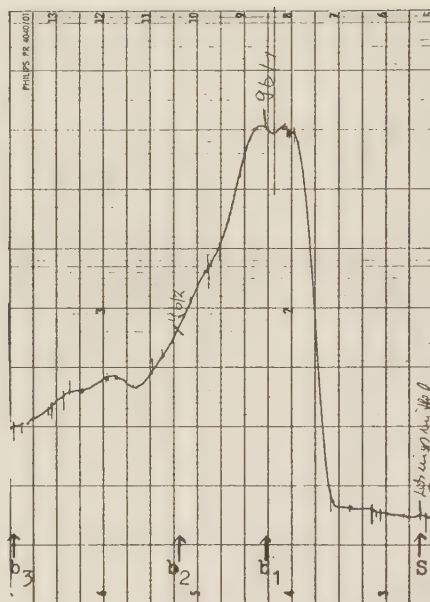


Abb. 4: Extinktionskurve (240 nm) des über eine Kieselgelsäule fraktionierten 20-Minuten-Hauptwertes von Proband Nr 3 . Im Kurvenabschnitt $b_1 - b_2$ Separierung der Fraktion, die das DI enthält, im Kurvenabschnitt $b_2 - b_3$ Separierung der Fraktion , die das D und körpereigenes Cortisol enthält. S = Start der Fraktionierung

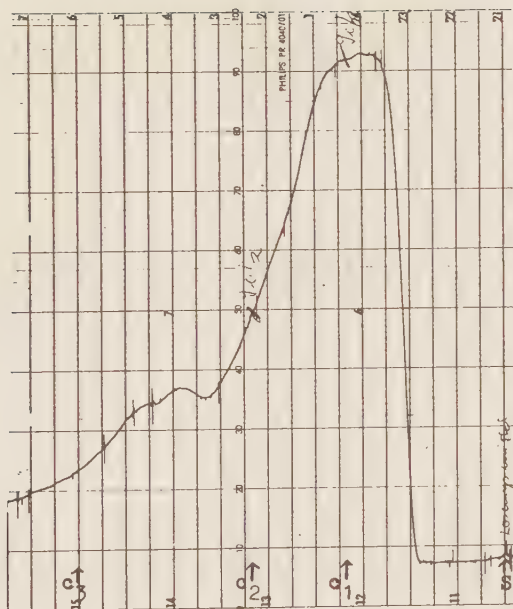


Abb. 5: Extinktionskurve (240 nm) des über eine Kieselgelsäule fraktionierten 40-Minuten-Hauptwertes von Proband Nr 3 . Im Kurvenabschnitt $c_1 - c_2$ Separierung der Fraktion, die das DI enthält, im Kurvenabschnitt $c_2 - c_3$ Separierung der Fraktion, die das D und körpereigenes Cortisol enthält.
S = Start der Fraktionierung

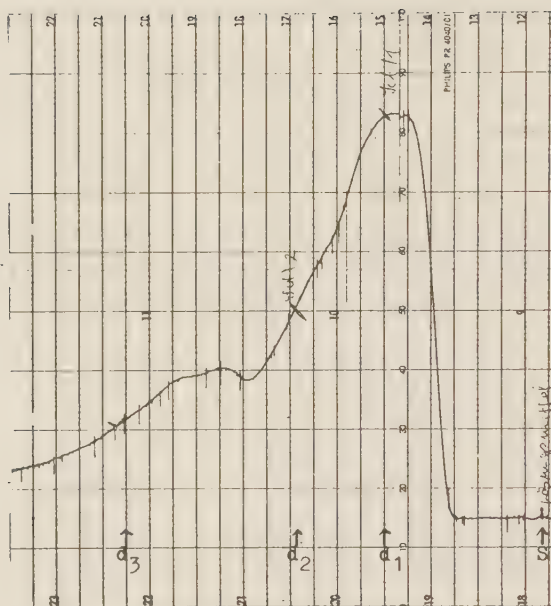


Abb. 6: Extinktionskurve (240 nm) des über eine Kieselgelsäule fraktionierten 60-Minuten-Hauptwertes von Proband Nr 3 . Im Kurvenabschnitt $d_1 - d_2$ Separierung der Fraktion, die das DI enthält, im Kurvenabschnitt $d_2 - d_3$ Separierung der Fraktion, die das D und körpereigenes Cortisol enthält.
S = Start der Fraktionierung

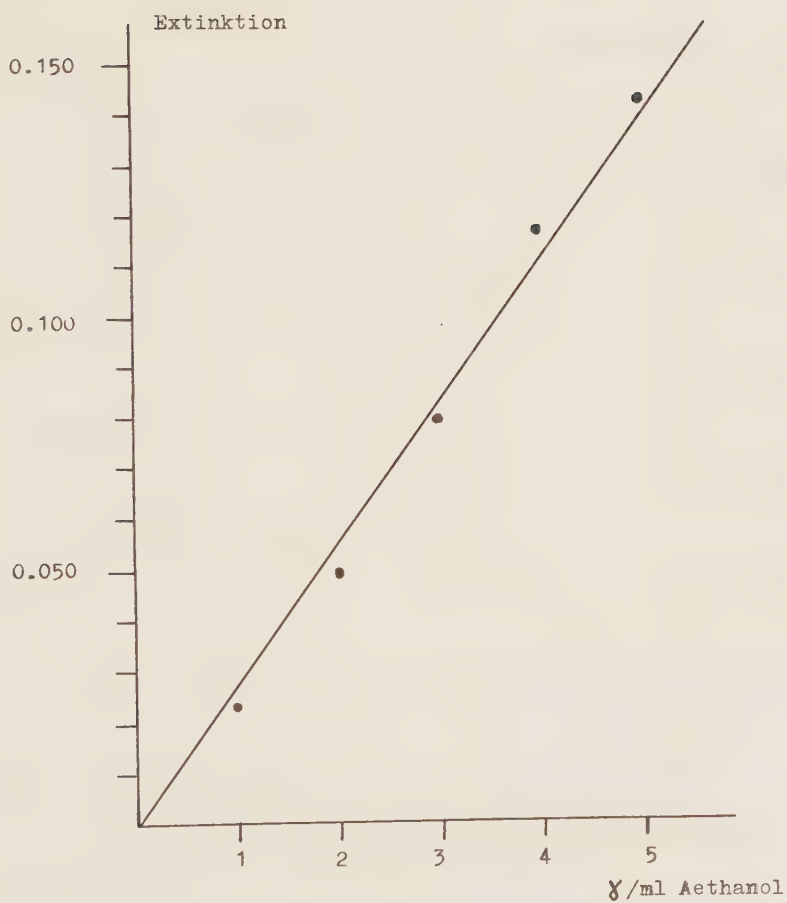


Abb. 7: Mittels Tetrazolblaureaktion gewonnene
Dexamethasonisonikotinat-Eichkurve

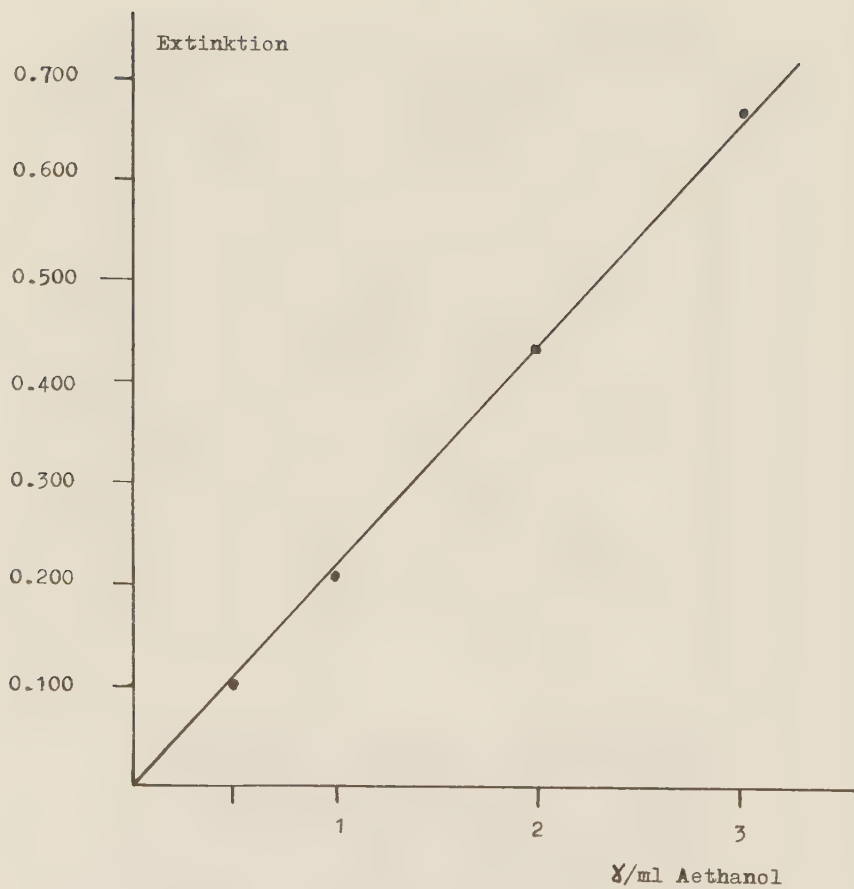


Abb. 8: Mittels Tetrazolblaureaktion gewonnene
Dexamethason-Eichkurve

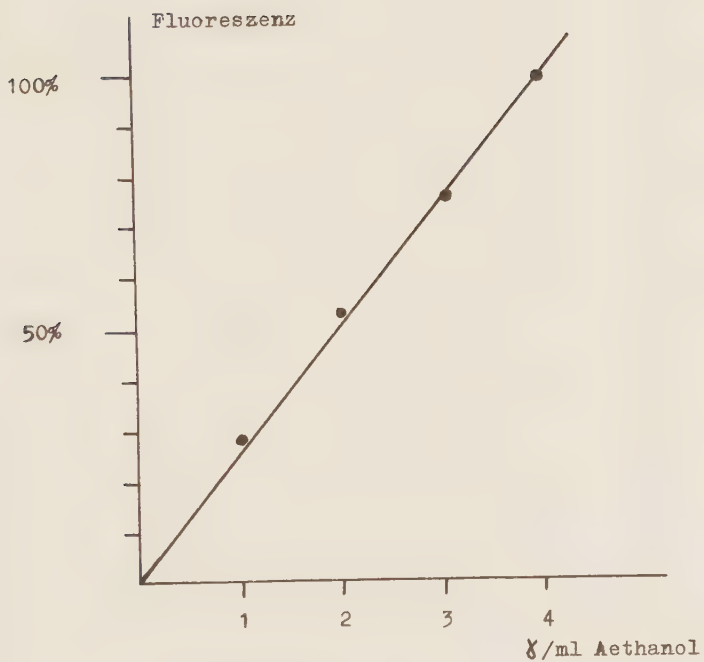


Abb. 9: Mittels der Fluoreszenzreaktion gewonnene Cortisoleichkurve

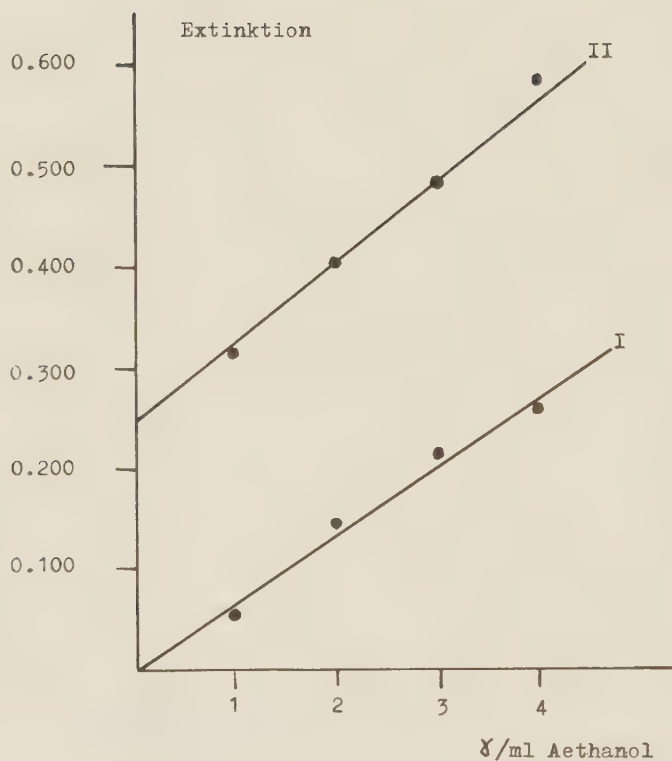


Abb. 10: Mittels Tetrazolblaureaktion gewonnene Eichkurve von Cortisol (I) sowie von Cortisol, dem jeweils 4 γ Dexamethason zugesetzt wurden (II) .

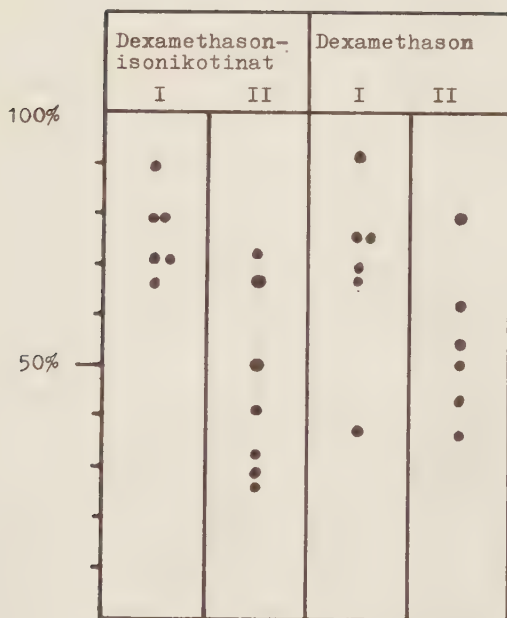


Abb. 11: Die Wiedergewinnungsrate der Nachweismethode für Dexamethason-isonikotinat und Dexamethason in Prozenten bei der Anwendung von Reinsubstanzen (I) sowie bei Zusatz zu menschlichem Plasma (II).

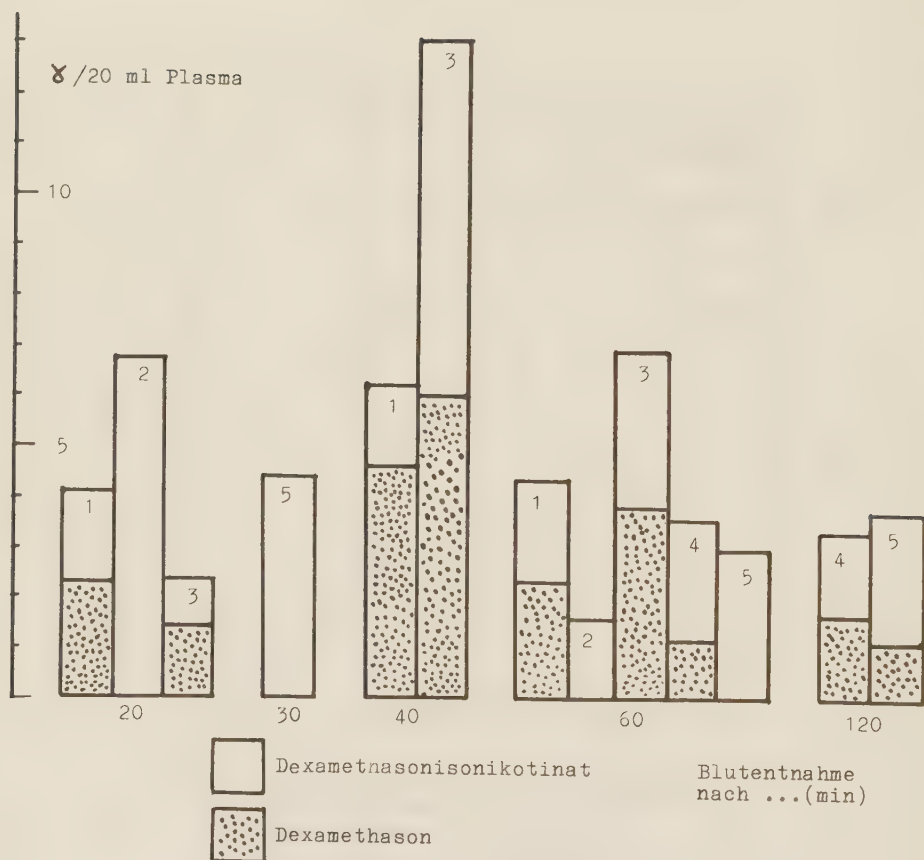


Abb.12: Graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tab. 1 und Tab. 2. Die Zahl in jeder Säule ist die Probanden-Nr.

Für Überlassung des Themas
bin ich Herrn Professor Dr. R. Schubert
zu großem Dank verpflichtet.

Ebenfalls gilt mein Dank
Herrn Oberarzt Dr. Staudacher für
seine zahlreichen Hinweise und
Anregungen.

LEBENS LAUF

Ich wurde am 1. Juni 1939 als erstes Kind des Chirurgen Dr. Otto Jordan und seiner Ehefrau Gertraud geb. Schmidbauer geboren.

Ich besuchte in Nürnberg die Grundschule und das alte humanistische Gymnasium, das ich im Jahre 1958 mit der Reifeprüfung abschloß.

Von 1958 - 1959 genügte ich meiner Wehrpflicht.

Im WS 59/60 begann ich das Studium der Humanmedizin in München. Nach dem WS 61/62 legte ich dort das Physikum mit der Note befriedigend ab.

Die klinischen Semester verbrachte ich ebenfalls in München, wo ich im Januar 1966 das Staatsexamen mit der Note gut bestand.

Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich zum Teil im Stadtkrankenhaus Fürth/Bayern und zum Teil in den Städt. Krankenanstalten Nürnberg ab. Im April 1968 erhielt ich die Bestallung als Arzt.

Anschließend arbeitete ich für ein Jahr an der 2. Chirurgischen Klinik der Städt. Krankenanstalten Nürnberg als Assistenzarzt. Im September 1969 wechselte ich in die Anaesthesieabteilung deselben Hauses über. Hier bin ich seitdem als Assistenzarzt tätig.

Miro Schmid

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen Hauptstr. 109, (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990